

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE RESIDUOS DE
ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS EN LECHE FRESCA
BOVINA, EN LA MICROCUENCA DEL DISTRITO DE TARACO -
PUNO**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. FREDY FELIPE HUARANCA SOSA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS
BETALACTÁMICOS EN LECHE FRESCA BOVINA, EN LA MICROCUENCA
DEL DISTRITO DE TARACO - PUNO.

PRESENTADA POR:

Bach. FREDY FELIPE HUARANCA SOSA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR:

PRESIDENTE:

Dr. ALBERTO CCAMA SULLCA

PRIMER MIEMBRO:

M.Sc. MARIO RUBÉN ZAVALA GIBAJA

SEGUNDO MIEMBRO:

M. Sc. WILBUR RUBÉN AYMA FLORES

DIRECTOR / ASESOR:

D.Sc. FAUSTINO A. JAHUIRA HUARCAYA

Área : salud pública

Tema : residuos de antibióticos en leche bovina

Fecha de Sustentación: 05/10/2018

DEDICATORIA

A mis padres, Felipe e Hilda, por todo el apoyo brindado en todos los momentos de mi vida. De sobremanera a mi madre que siempre está a mi lado en los momentos más difíciles.

A mi hermana Yovanita, por sus palabras y apoyo incondicional desde el exterior.

A Delia, en quien descubrí el amor verdadero, por la confianza y el tiempo dedicado. A mis docentes, amigos y compañeros que me brindaron su apoyo de alguna u otra manera.

AGRADECIMIENTO

A la gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, por haberme abierto sus puertas al mundo científico, por brindarme la oportunidad de formarme en ella y consolidar mis objetivos.

Al Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, donde pude evidenciar el viejo refrán “la experiencia es la madre de todas las ciencias”. A sus docentes: Drs. Rolando Rojas, Rolando Alencastre, Máximo Melo y Japhet Zapana. A mis compañeros del internado, con los que compartí gratos momentos.

A mi director de tesis Dr. Faustino Jahuira, a los miembros del jurado, al personal administrativo de la FMVZ, señores Vicente y Martín, los que cooperaron en la realización de las pruebas del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
I. INTRODUCCIÓN	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 Leche.....	15
2.1.1 La leche como alimento humano	16
2.1.2 La leche como alimento del ternero	17
2.1.3 Calidad de leche	17
2.1.4 Factores que desmejoran su calidad.	19
2.1.5 Importancia de la buena calidad.	19
2.1.6 Inhibidores en leche.	20
2. 2 Los antibióticos.....	22
2.2.1 Antibióticos betalactámicos.....	22
2.2.2 Penicilinas.....	23
2.2.3 Propiedades fisicoquímicas	25
2.2.4 Mecanismo de acción	26
2.2.5 Farmacocinética.....	26
2.2.6 Toxicidad y efectos adversos.....	28
2.2.7 Tiempo de retiro.....	29
2.3 La prueba de Delvotest® SP – NT.....	31
2.4 Residuos de medicamentos en leche.....	33
2.4.1 Causas más comunes de aparición de residuos de antibióticos.....	34
2.4.2 Implicancias en la industria láctea.....	35
2.4.3 Sustancias antimicrobianas controladas	36
2.4.4 Límite máximo de residuos	36
2.5 antecedentes	37
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
3.1 Ubicación.....	42
3.2 Muestra.....	42

3.3 Materiales de laboratorio	43
3.4 Equipos.....	43
3.5 Cultivo.....	43
3.6 Metodología.....	44
3.6.1 Recolección y transporte de muestras	45
3.6.2 Análisis de datos	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1 Resultados.....	47
4.1.1 Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina en la Microcuenca del distrito de Taraco.	47
4.2 Discusión	48
V. CONCLUSIONES	52
VI. RECOMENDACIONES.....	53
VII. REFERENCIAS	54
ANEXOS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: presencia de residuos de antibióticos por épocas.	58
Figura 2: presencia de residuos de antibióticos en las comunidades del distrito de Taraco.	58
Figura 3: colección de muestras en campo.	59
Figura 4: refrigerado de muestras.	59
Figura 5: remitido de muestras al laboratorio.	60
Figura 6: kit Delvotest.	60
Figura 7: adición de muestra a las ampollas de la prueba.	61
Figura 8: incubación de la muestra.	61
Figura 9: observación pos incubación.	62
Figura 10: lectura de coloración.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: clasificación de las penicilinas.....	24
Tabla 2: nivel de detección con Delvotest® SP - NT en leche bovina cruda mezclada.	32
Tabla 3: niveles de tolerancia de algunos antimicrobianos.	34
Tabla 4: límites máximos de residuos de antibióticos betalactámicos.....	37
Tabla 5: determinación de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina en la microcuenca del distrito de Taraco.	47
Tabla 6: determinación de residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina, por épocas, en la microcuenca del distrito de Taraco.	47
Tabla 7: muestras positivas por comunidades del distrito de Taraco.	48

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- FAO** : Food and Agriculture Organization (Organización para la Alimentación y la Agricultura)
- OMS** : Organización Mundial de la Salud
- USDA** : United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).
- IM** : Intra Muscular
- VO** : Vía Oral.
- SC** : Sub Cutáneo
- ng/mL** : nano gramos por mililitro.
- µg/mL** : micro gramos por mililitro.
- HACCP** : Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control.
- UFC/mL** : Unidades Formadoras de Colonias por mililitro.
- UI/kg** : Unidades Internacionales por kilogramo.

RESUMEN

Para la ejecución del presente estudio se colectaron muestras de leche bovina en las comunidades de mayor producción de leche bovina del distrito de Taraco, con la finalidad de determinar la presencia de residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina a través de la técnica de Difusión Estándar Delvotest SP - NT. Los análisis se realizaron en el laboratorio de bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno. Se trabajó con un total de 100 muestras durante los meses de febrero y abril del 2018, en todo el estudio se encontró que el 20% de muestras son positivos a residuos de antibióticos betalactámicos. En época de lluvia, mes de febrero, se colectó 50 muestras, de los cuales 13 fueron positivos, representando el 26%. En época de seca, mes de abril, se colectaron también 50 muestras, de los cuales 7 fueron positivas, representando el 14%. La leche contaminada con residuos de antibióticos se comercializa a pesar de su prohibición por normas técnicas nacionales e internacionales como de DIGESA, HACCP y *Codex Alimentarius* respectivamente, por representar un peligro para la salud pública y la industria láctea.

Palabras Clave: residuos, antibióticos, leche fresca.

ABSTRACT

For the execution of this study, samples were collected in the communities with the highest production of bovine milk from the district of Taraco, in order to determine the presence of antibiotic residues in raw milk through the Delvotest SP - NT Standard Diffusion method. The analyzes were carried out in the biochemistry laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of Altiplano - Puno. We worked with a total of 100 samples during the months of February and April of 2018, throughout the study it was found that 20% of samples are positive to residues of beta-lactam antibiotics. During the rainy season, in February, 50 samples were collected, of which 13 were positive, representing 26%. In the dry season, in April, 50 samples were also collected, of which 7 were positive, representing 14%. Milk contaminated with antibiotic residues is marketed despite its prohibition by national and international technical standards such as DIGESA, HACCP and Codex Alimentarius respectively, as it represents a danger to public health and the dairy industry.

Key Words: Residues, antibiotics, fresh milk.

I. INTRODUCCIÓN

En la crianza de ganado lechero existen muchos problemas con los que el criador tiene que enfrentarse, los animales, como cualquier ser vivo, están expuestos a padecer alguna enfermedad infecciosa durante su vida productiva. Los medicamentos antibacterianos se han convertido en una solución apropiada para el tratamiento de éstas enfermedades.

Después de administrar un medicamento a un animal, tiene lugar un proceso metabólico que favorece su eliminación, en términos generales, la mayor parte del producto y de sus metabolitos se excretan por la orina y las heces, sin embargo, también se pueden encontrar estos productos en la leche o en la carne (Parra y col., 2003).

Los residuos de medicamentos veterinarios y sustancias químicas, son un riesgo para la población humana, porque ocasionan problemas de resistencia bacteriana, reacciones alérgicas e intoxicaciones (Croall, 1999).

En todos los casos, el uso de medicamentos plantea un problema de salud pública, en la medida que estos pueden originar residuos en los alimentos derivados de los animales tratados; por lo tanto, la utilización de cualquier medicamento, debe estar ligada a dos conceptos básicos: el respeto del tiempo o periodo de retiro y la aparición o presencia de residuos en los productos de animales tratados (Parra y col., 2003).

El problema se agudiza cuando se usa los antibióticos de manera indiscriminada por personal no capacitado y el incumplimiento del periodo de retiro, las mismas que repercutirán en la calidad de la leche que tanto se habla en estos últimos tiempos. En las experiencias de campo que se tiene, la

enfermedad con mayor incidencia en ganado de leche es la mastitis y para tal tratamiento se utiliza los antibióticos del grupo de beta lactámicos.

Una leche de buena calidad debe reunir características adecuadas de composición (contenido de proteína, grasa, sólidos totales, minerales y vitaminas), no contener un número excesivo de microorganismos (<50.000 UFC/mL), estar libre de sustancias extrañas y residuos químicos e inhibidores (antibióticos, pesticidas y otros), ausencia de cuerpos extraños y de agentes patógenos (Cabrera y col, 2003).

En lo referido a calidad, las normas HACCP es un enfoque sistematizado, que permite identificar peligros, estimar riesgos e instrumentar medidas de control. Su objetivo fundamental es prevenir y evitar problemas de origen microbiológico, químico y/o físico, con la finalidad de preservar la salud de la población. Los principios de este método pueden utilizarse en cualquiera de los diferentes eslabones de la cadena alimentaria (Páez y col., 1999).

Aunque los residuos solo se encuentren en los alimentos en muy baja concentración, es posible que la ingestión regular de pequeñas cantidades, de una misma sustancia, pueda determinar manifestaciones tóxicas, a largo plazo, por efectos acumulativos. Los efectos tóxicos pueden agruparse en directos e indirectos. Son efectos directos, aquellos producidos por la utilización de antibióticos en condiciones terapéuticas. Se manifiestan en variadas formas clínicas como: toxicidad en riñón, hígado, sangre, médula, oído, efectos teratogénicos, carcinogénicos y alergias graves. Los efectos indirectos son los asociados a los fenómenos de resistencia bacteriana y a las reacciones alérgicas. Además, los antibióticos presentes en la leche pueden inducir

alteración de la flora intestinal, desarrollo de microorganismos patógenos y reducción de la síntesis de vitaminas (Parra y col., 2003).

Los residuos de antibióticos en la leche, además de ser un peligro para la salud humana y los procesos de industrialización de la leche, tienen implicancias económicas (descuentos por venta de leche con presencia de inhibidores, menores precios, etc.). El mercado actual de lácteos es cada vez más exigente en productos libres de residuos; por lo tanto, obtener leche libre de antibióticos, es un elemento esencial para la comercialización.

Por todo lo mencionado, el objetivo general de este trabajo de investigación fue: determinar la presencia de residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina en la microcuenca del distrito de Taraco. Detectar residuos de antibióticos en dos épocas del año en la microcuenca del distrito de Taraco y utilizar la prueba cualitativa Delvotest® SP-NT para detectar residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca, en el distrito de Taraco.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Leche

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación FAO (Food an Agriculture Organization), la leche es el producto de la secreción mamaria, obtenido por uno o varios ordeños, sin adición o sustracción alguna.

La leche es una emulsión de materia grasa en una solución acuosa, que contiene numerosos elementos, unos en disolución y otros en estado coloidal; por lo tanto, la leche tiene la propiedad de ser una mezcla física y química, compuesta por agua, grasa, proteínas, azúcares, minerales, vitaminas, enzimas y algunos materiales celulares de la glándula mamaria (Veisseyre, 1980).

Es un producto integro de la secreción mamaria sin adición ni sustracción alguna y que ha sido obtenida mediante el ordeño. La designación de “leche” sin especificaciones de la especie productora corresponde exclusivamente a la leche de vaca mientras que a las leches obtenidas de otras especies les corresponde, la denominación de leche, pero seguida de la especificación del animal productor (NTP 202.001:2003).

Debido a su alto valor nutritivo, las leches, en general, representan el alimento más balanceado y apropiado para el consumo. Además de proporcionar prácticamente todos los nutrientes necesarios, también

contienen diferentes sustancias que actúan como parte fundamental de los sistemas inmunológico y de protección (Badui, 2006).

2.1.1 La leche como alimento humano

La leche de excelente calidad es un producto alimenticio de gran valor nutricional, con un contenido compensado de aminoácidos, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales, y bajo contenido de gérmenes patógenos, de células somáticas, con ausencia de cuerpos extraños y con sabor y olor normales. La leche es una fuente excelente de la mayoría de minerales requeridos para el crecimiento del lactante y para el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto (Parra y col., 2003).

Según la FAO el consumo de leche es fundamental durante la niñez y la adolescencia, y también en la dieta diaria de las personas de la tercera edad y mujeres embarazadas. El papel de la leche y los productos lácteos en la nutrición humana es esencial. Un vaso al día de 200 mL de leche entera de vaca aporta a un niño de 5 años (por término medio) un 21% de las necesidades proteicas y un 8 % de las calóricas y micronutrientes esenciales. Además, provee al organismo de otros nutrientes necesarios para su correcto funcionamiento como la vitamina D, A, B12 y otras vitaminas del complejo B (FAO).

2.1.2 La leche como alimento del ternero

La leche posee las inmunoglobulinas que el ternero necesita para defenderse de los organismos infecciosos (virus, bacterias, etc). La concentración de inmunoglobulinas en el calostro es un factor muy importante para asegurar un nivel adecuado de inmunoglobulinas séricas, en el ternero recién nacido. El calostro debe ser suministrado al ternero lo más pronto posible después del nacimiento, pues su capacidad de absorción decrece casi a cero a las 36 horas de edad. Las inmunoglobulinas son estables en el torrente circulatorio del ternero por 60 días, otorgando protección, hasta que el sistema inmune es funcional. El calostro puede almacenarse congelado para dárselo a otros terneros (Wattiaux, 2003).

2.1.3 Calidad de leche

La calidad es determinada por las características físico-químicas y bacteriológicas que determinan la composición de los productos. Una leche de buena calidad debe reunir las siguientes características: adecuada composición (contenidos de proteína, grasa, sólidos totales, minerales y vitaminas), no contener un número excesivo de microorganismos (<50.000 UFC/ml), estar libre de libre de sustancias extrañas (calostro, sedimentos) y de residuos químicos e inhibidores (antibióticos, pesticidas y otros), ausencia de cuerpos extraños y de agentes patógenos (brucelosis, tuberculosis, paratuberculosis y salmonella, entre otros), y poseer adecuadas características organolépticas (sabor y

olor normales) (Cabrera y col., 2003; Cotrino y Gaviria, 2003).

La calidad de la leche depende de las condiciones climáticas y de los factores fisiológicos normales de los animales que la producen, de factores genéticos, de la nutrición y salud de las vacas, de las condiciones en que se ordeña, y del manejo dado al producto hasta llegar al consumidor. La calidad de la leche puede estar afectada igualmente por el contenido de residuos de origen químico (Parra y col., 2003).

La leche cruda de buena calidad no debe contener residuos ni sedimentos; no debe ser insípida ni tener color y olor anormales; debe tener un contenido de bacterias bajo; no debe contener sustancias químicas (por ejemplo, antibióticos y detergentes), y debe tener una composición y acidez normales. La calidad de la leche cruda es el principal factor determinante de la calidad de los productos lácteos. No es posible obtener productos lácteos de buena calidad sino de leche cruda de buena calidad. La calidad higiénica de la leche tiene una importancia fundamental para la producción de una leche y productos lácteos que sean inocuos e idóneos para los usos previstos. Para lograr esta calidad, se han de aplicar buenas prácticas de higiene a lo largo de toda la cadena láctea. Los productores de leche a pequeña escala encuentran dificultades para producir productos higiénicos por causas como la comercialización, manipulación y procesamiento informal y no reglamentada de los productos lácteos; la falta de

incentivos financieros para introducir mejoras en la calidad, y el nivel insuficiente de conocimientos y competencias en materia de prácticas de higiene (FAO).

2.1.4 Factores que desmejoran su calidad.

La leche es una sustancia que se contamina fácilmente, debido a su composición química y a su elevada cantidad de agua; por lo tanto, una deficiente higiene durante el ordeño y el insuficiente cuidado en el tratamiento y almacenamiento, al igual que las enfermedades de la ubre, desmejoran la calidad de la leche y la pueden convertir en un producto nocivo. Además, el uso de medicamentos, aunado al fenómeno de la contaminación ambiental, hace que se puedan almacenar residuos de compuestos químicos o sus metabolitos en tejidos u órganos animales, que al ser consumidos por la población humana, pueden convertirse en un problema de salud pública. Por ello es necesario adoptar medidas de control, para minimizar los riesgos de contaminación (Parra y col., 2003).

2.1.5 Importancia de la buena calidad.

Es importante contribuir al mejoramiento de la calidad de la leche, porque es un alimento de alto valor nutritivo, y es esencial en la dieta del ser humano en sus primeros meses de vida; además, con la apertura de los mercados, las únicas restricciones para el libre comercio de la leche están basadas en su calidad composicional y bacteriológica, así como en la ausencia de

residuos considerados como tóxicos y nocivos para el consumidor. Por lo tanto, se deben desarrollar programas para el uso racional de medicamentos y sustancias químicas, para el control de enfermedades y para procesos de limpieza y desinfección en las fincas (Cotrino, 2001).

Las sustancias inhibidoras en la leche dificultan los procesos de acidificación y maduración en el proceso para convertirla en productos de leche ácida y en quesos. Al mejorar la calidad de la leche, se obtienen mayores rendimientos en la industria e incrementos en calidad, vida útil y aceptación de los productos en el mercado. Además, se obtienen bonificaciones por higiene, con mejores ingresos para los productores (Parra y col., 2003).

Los consumidores y las autoridades encargadas de la reglamentación, son cada vez más conscientes de los riesgos que los microorganismos y residuos químicos en el entorno agrícola, representan para la salud pública. La implementación de programas de protección alimentaria en la granja, que prevén el manejo cotidiano de cada unidad de producción, para garantizar la sanidad y el bienestar de los animales, y la salud pública y medioambiental, debe ser el primer objetivo de los productores y veterinarios (Parra y col., 2003).

2.1.6 Inhibidores en leche.

Los inhibidores en leche han sido definidos como toda sustancia química o biológica que al ser administrada o consumida por el

animal, se elimina o permanece como metabolito en la leche, con efectos nocivos para el consumidor. Estas sustancias no sólo incluyen a los antibióticos empleados en el tratamiento de enfermedades infecciosas, también incluyen los desinfectantes y detergentes usados en los procesos de limpieza y desinfección, y los pesticidas para el control de garrapatas, moscas y maleza. Los residuos antibióticos son los inhibidores artificiales más comunes presentes en la leche de vaca, con un impacto negativo sobre la salud humana, procesamiento y calidad de la leche. Los residuos antibióticos representan el principal problema en la producción segura y de buena calidad de los productos animales (Llanos, 2002).

Se llaman inhibidores, porque detienen o inhiben por ejemplo en la fermentación microbiana del yogur, al contener residuos de antibióticos en la leche, ésta no podrá fermentar o acidificar porque las bacterias acidificantes del yogur, serán eliminadas por el efecto del antibiótico residual en la leche.

También existen inhibidores naturales de la leche, por ejemplo, la lactoferrina y la lactoperoxidasa, impiden un aumento significativo del número de bacterias en las primeras tres o cuatro horas después del ordeño, a temperatura ambiente. El enfriamiento a 4 °C durante este período mantiene la calidad original de la leche y es el método preferido para garantizar un producto de buena calidad para la elaboración y el consumo (FAO).

2. 2 Los antibióticos

Se define como antibiótico, a un grupo de sustancias químicas orgánicas, las cuales son producidas, por ciertos microorganismos durante su crecimiento y que en cantidades muy pequeñas tienen un efecto nocivo o tóxico para otros microorganismos (Pérez, 2010).

Los antibióticos son sustancias producidas por microorganismos o plantas superiores de composición química muy diversa. Tienen la propiedad de inhibir los procesos metabólicos de las bacterias, bien sea destruyéndolas o inhibiendo su reproducción (Parra y col., 2003).

Los antibióticos en concentraciones sub terapéuticas, se utilizan en la producción animal para mejorar la conversión alimenticia, o como sustancias promotoras de crecimiento. Esta práctica está prohibida en algunos países, pues además de dejar residuos, contribuye a la aparición de resistencia bacteriana y puede causar daño al entorno dado que una parte de los antibióticos llega al medio ambiente y destruye los microorganismos necesarios para el crecimiento de algunas plantas (Rodríguez, 2003).

Los antibióticos más utilizados son: la penicilina, de tratamiento obligado en numerosas enfermedades infecciosas; las tetraciclinas, neomicina, bacitracina y estreptomycinina, entre otros (Parra y col., 2003).

2.2.1 Antibióticos betalactámicos.

Se define como antibiótico, a un grupo de sustancias químicas orgánicas, las cuales son producidas, por ciertos microorganismos durante su crecimiento y que en cantidades muy pequeñas tienen

un efecto nocivo o tóxico para otros microorganismos (Pérez, 2010).

Reciben esta denominación todos aquellos antibióticos en cuya estructura química presentan un anillo betalactámico, característica que les permiten compartir mecanismos de acción similares. En efecto, ambos grupos de antibióticos actúan interfiriendo los mecanismos enzimáticos necesarios para la formación de mureína, mucopolisacárido altamente necesario para la formación de la pared celular de ciertos gérmenes (Pérez, 2010).

2.2.2 Penicilinas

Uno de los grupos antibióticos más generosos desde el punto de vista de su eficacia y casi nula toxicidad es el de las penicilinas. A pesar de su acierto e intuición, quizá sir Alexander Fleming no advirtió integralmente el amplio campo de oportunidades terapéuticas que brindarían sus compuestos originales descubiertos en los años de 1928 y 1929. Diez años después, la purificación hecha por Florey, Chain y Abraham en Oxford permitió disponer de la penicilina en forma clínica. Aunque esta sustancia inicialmente se obtuvo del cultivo de *Penicillium notatum* en superficie, en la actualidad los cultivos en tanques de *Penicillium chrysogenum* irradiado hacen de la extracción de la penicilina un proceso fácil y productivo (Sumano y Ocampo, 2006).

Desde el punto de vista de su desarrollo, las penicilinas se clasifican en cuatro grupos:

- *Primera generación:* penicilina G, penicilina V, feneticilina y las resistentes a las penicilinasas, como meticilina, nafcilina, oxacilina, dicloxacilina y flucloxicilina.
- *Segunda generación o de amplio espectro:* ampicilina, amoxicilina y hetacilina.
- *Tercera generación o de amplio espectro mejorado:* ticarcilina, carbenicilina y bacampicilina.
- *Cuarta generación o amidinopenicilinas:* mezlocilina, piperacilina y azlocilina.

Tabla 1: clasificación de las penicilinas.

Naturales	Resistentes a penicilinasas	Aminopenicilinas	De amplio espectro
Penicilina G sódica	cloxacilina	Ampicilina	Ticarcilina
Penicilina G potásica, procaínica y benzatínica	dicloxacilina	Amoxicilina	Carbenicilina
Fenoximetilpenicilina V	Nafcilina	Hetacilina	Combinación con: ácido clavulánico, sulbactam, bacampicilina o azlocilina.
	Meticilina		
	Flucloxicilina		

Fuente: Sumano y Ocampo, 2006

2.2.3 Propiedades fisicoquímicas

La penicilina es higroscópica, aunque la sal potásica lo es menos que la sódica o la cálcica y sufre hidrólisis de manera rápida. Existen preparaciones ya solubilizadas a las que se añaden diversos estabilizantes o conservadores. Es importante hacer énfasis en que uno de esos estabilizantes es la carboximetilcelulosa, que ha resultado capaz de generar reacciones de hipersensibilidad graves en bovinos, incluso letales. Las penicilinas sufren un rápido deterioro de su potencia en presencia de ácidos o álcalis, y la mayoría son estables en soluciones amortiguadoras de fosfato y citrato con pH de 6-6.5. La velocidad con que se alteran las penicilinas en solución aumenta con la temperatura. Las soluciones inyectables se deben preparar poco antes de su administración, y las sales mantenerse en un ambiente fresco. Las soluciones y suspensiones disponibles en el mercado se deben almacenar en lugares frescos y protegidos de la luz solar. La mayor parte de los agentes oxidantes destruye con rapidez las penicilinas. Los agentes reductores ocasionan un efecto similar (Sumano y Ocampo, 2006).

Cuando las penicilinas se combinan casi siempre se inactivan, pero existen algunas excepciones en las que se obtiene una mezcla estable, por ejemplo, ampicilina o amoxicilina combinadas con ácido clavulánico y algunas otras preparaciones en que se incorporan liposomas. Se recurre al blindaje para proteger la

ampicilina y así poder combinarla con gentamicina (Pérez, 2010).

2.2.4 Mecanismo de acción

Todos los antibióticos betalactámicos interfieren con la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. Después de la interacción con los puntos de unión en la bacteria, denominadas proteínas ligantes de penicilina, inhiben la enzima de transpeptidación, impidiendo el enlazamiento de los péptidos con las cadenas de polisacáridos adyacentes, necesarios para la formación de la pared microbiana. La importancia de la pared en los gérmenes reside en la necesidad de proteger la integridad microbiana frente a las diferencias de osmolaridad que existen entre el medio externo y el interior de la bacteria. Las penicilinas al interferir con la formación de la pared, facilitan la lisis del microorganismo. El efecto bactericida final es la inactivación de un inhibidor de las enzimas autolíticas en la pared celular, esto conduce a lisis de la bacteria. Las diferencias observadas respecto de los gérmenes gramnegativos se relacionan con el hecho de que estas bacterias tienen una mayor capacidad de síntesis de productos, lo que las hace altamente adaptables y no dependientes de una fuerte pared protectora como las gram positivas (Pérez, 2010).

2.2.5 Farmacocinética

Las penicilinas naturales sólo se administran por vía parenteral. Después de 30 min de su inyección por vía IM, las penicilinas

alcanzan valores terapéuticos en sangre que son superiores a 0.03 $\mu\text{g/ml}$, aunque hay datos que aseguran la obtención de cifras terapéuticas en sólo 15 min. La cinética de absorción parenteral es similar en la mayoría de las penicilinas naturales o semisintéticas. Las penicilinas acidorresistentes, como la penicilina V o fenoximetilpenicilina, se pueden administrar por VO y siguen una cinética de absorción similar a la observada en la aplicación IM de las penicilinas en general, por lo que si se requieren valores más altos en sangre, debe recurrirse a la vía IV. Se ha demostrado que en bovinos y equinos, la administración de 20 000 UI/kg de penicilina G procaínica genera concentraciones plasmáticas mayores de las mencionadas. Se han aplicado dosis de 50 000 UI/kg o más y no se sobrepasa ese punto. La única forma de lograr concentraciones ligeramente superiores es disminuyendo el intervalo de dosificación y administrar las 20 000 UI, de preferencia en la tabla del cuello y de manera profunda. En perros se ha establecido que la bencilpenicilina G procaínica, sódica, potásica o benzatínica pueden administrarse por vía SC, con lo que se obtiene una cinética similar a la propia de la aplicación IM. Por la seguridad de esta vía para los propietarios, se puede recomendar en los casos en que se requiera un seguimiento de la terapia a base de penicilina G. Definitivamente, la VO no se recomienda para las penicilinas naturales, debido a que se destruyen por el pH del estómago. Algunas penicilinas semisintéticas han salvado este obstáculo; tal es el caso de penicilina V, fenoxietilpenicilina,

oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, nafcilina, acidocilina, hetacilina, amoxicilina trihidratada y ampicilina trihidratada (Sumano y Ocampo, 2006).

Los preparados constituidos por mezclas de penicilina procaínica y penicilinas cristalinas (penicilina G sódica y G potásica) por vía IM sólo alcanzan un máximo de 2.54 µg/ml en sangre; para lograr valores más altos se recomienda utilizar la misma dosis acortando el intervalo de dosificación (Pérez, 2010).

No se ha comprobado que con la mezcla de las tres penicilinas (sódica-potásica, procaínica y benzatínica) se logren por vía IM valores altos y duraderos, y aunque existen preparaciones comerciales que así se publicitan, no se ha llevado a cabo un ensayo bien diseñado para demostrarlo. De hecho se ha demostrado que la bencilpenicilina no logra concentraciones terapéuticas en plasma ni en tejidos en bovinos o equinos. A pesar de esto, existen muchos preparados comerciales con dicha sal, combinada con penicilina G procaínica, lo cual seguramente reduce la eficacia clínica del tratamiento con penicilina G en grandes especies. Esto no aplica a cerdos, pequeños rumiantes o pequeñas especies. Adicionalmente, la administración de penicilina G benzatínica genera residuos en carne y leche hasta por un mes (Sumano y Ocampo, 2006).

2.2.6 Toxicidad y efectos adversos.

Una de las principales ventajas que presenta la penicilina es su

escasa toxicidad por lo que presenta un amplio índice terapéutico. Sin embargo, su uso no está exento de provocar reacciones alérgicas en los animales y en el hombre. La frecuencia de reacciones de hipersensibilidad varía con la vía de administración y la formulación farmacéutica. La mayor frecuencia se observa luego de la administración de preparados inyectables. Las reacciones de hipersensibilidad pueden ir desde ligeras reacciones cutáneas hasta el choque anafiláctico fatal (Pérez, 2010).

2.2.7 Tiempo de retiro.

La penicilina interfiere en la transformación de la leche en otros derivados; por ejemplo, su acción inhibitoria sobre bacterias coagulantes de la leche impide la elaboración de quesos. Es importante que el médico veterinario evite que se comercialice leche de vacas tratadas con betalactámicos cuando no se ha respetado el tiempo de retiro de la ordeña. Aunque en muchas compañías grandes se realizan pruebas para verificar que no existan residuos, gran parte de la leche que se consume en México no está vigilada. Las consecuencias para la salud pública incluyen el desarrollo de resistencias y la sensibilización de sujetos susceptibles a reacciones alérgicas, incluso anafilácticas. Las pruebas de verificación de la presencia de betalactámicos que se expenden comercialmente se realizan en la misma granja y son tan sensibles, que pueden detectar la presencia de 10 ng/mL de algún betalactámico como en el caso de las pruebas denominadas SNAP. Las penicilinas se pueden administrar por vía intramamaria

para el tratamiento de la mastitis, pero la presencia de residuos en leche es un problema de salud pública y para la elaboración de productos lácteos. Debido a esto, resulta de suma importancia el vehículo utilizado para la infusión intramamaria, porque en parte determina el tiempo de retiro de la ordeña; p. ej., si se usa un vehículo muy liposoluble, permanecerá por más tiempo en la ubre que una presentación con vehículo acuoso. El primero está indicado en el secado de las vacas y el segundo en la presentación clínica de mastitis. Se debe recordar que con una aplicación a un cuarto mamario se logra suficiente absorción y distribución para contaminar la leche de los otros tres cuartos. La penicilina G sódica y la potásica se absorben por vía intrauterina, dando lugar a residuos detectables en leche durante un mínimo de 12 h; si se aplicó penicilina G procaínica, los residuos permanecerán como mínimo unas 36 h. Cuando esta leche se da a los becerros, se requerirán 24 h de retiro de ordeña para la eliminación de residuos de penicilina a un nivel aceptable para esta especie. Si se quiere usar la leche para consumo humano, se deberá retirar a las vacas cinco a siete días de la ordeña y realizar pruebas de detección de betalactámicos en leche (Sumano y Ocampo, 2006).

Las compañías farmacéuticas fijan el tiempo de retiro de la leche, fundamentadas en las propiedades farmacocinéticas de las distintas formulaciones en vacas en ordeño, y en los estudios toxicológicos en humanos. En general, los períodos de retiro oscilan entre cuatro a seis días para los antibióticos más

comúnmente administrados, y es raro que se eliminen residuos de antibióticos por un período mayor, que el tiempo de retiro declarado por el fabricante del fármaco (Parra y col., 2003).

2.3 La prueba de Delvotest® SP – NT

El método Test cualitativo o Delvotest® SP - NT es una prueba de difusión estándar para la detección de los residuos de sustancias antibacterianas (tales como antibióticos y sulfonamidas). Delvotest® SP (*Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*), es un test rápido que inhibe el crecimiento y la producción de ácido del microorganismo *Bacillus stearothermophilus* variedad *Calidolactis*. Con la adición de leche y la subsecuente incubación, el microorganismo germina y produce ácido carbónico. Es un test simple, sensible y relativamente rápido, cuando se compara con otras pruebas. Su uso está aprobado por la FDA (Administración de alimentos y fármacos, por sus siglas en inglés) y es reconocido por la AOAC (Asociación americana de químicos analistas, por sus siglas en inglés) desde 1982. Es considerado de amplio espectro, ya que detecta antibióticos β -lactámicos, no- β -lactámicos, sulfas y tylosina, entre otros (Camacho y col. 2010).

La sensibilidad de Delvotest ® SP-NT, aparte de las sensibilidades especificadas para las Penicilinas, muestra los rangos de sensibilidad para otros antibióticos y sustancias inhibitorias que pueden ser detectados, tales como aquellos definidos por el Nivel Máximo de Residuo (MRL). La tabla 2, da una visión de los niveles de detección de Delvotest SP-NT para residuos de diferentes antibióticos y sulfonamidas.

Las drogas enlistadas son una selección de la muestra del espectro de detección. El nivel de detección se refiere a la concentración más baja en la cual una droga es todavía detectada por la prueba, al tiempo control o al tiempo de lectura fijo de 3 horas (Alvarado y col, 2011).

Tabla 2: nivel de detección con Delvotest® SP - NT en leche bovina cruda mezclada.

Droga	Nivel de detección a tiempo de control (ppb o ng/ml)	Nivel de detección Lectura a 3 horas (ppb o ng/ml)
β-lactams		
penicilina	1 - 2	2 - 3
ampicilina	4	6 - 7
amoxicilina	2 - 3	3 - 5
ceftiofur	25 - 50	50 - 100
cefapirina	4 - 6	6 - 8
cloxacilina	20	20 - 30
dicloxacilina	10	10 - 20
oxacilina	10	10
Trimetoprim	50 -100	200 - 300

Fuente: Alvarado y col, 2011.

La prueba consiste en ampollitas que contienen al medio sólido agar sembrado de un número estandarizado de las esporas de *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*, junto con nutrientes requeridos para el crecimiento y un antifolante trimetoprim. El medio es coloreado

en púrpura por el indicador de pH púrpura de bromocresol. Cuando se procesan muestras de leche que están libres de sustancias antibacterianas o aquellas que contienen concentraciones por debajo de niveles especificados, se produce la germinación y crecimiento de la bacteria. Esto conducirá a un cambio en color del indicador de púrpura a amarillo. Sin embargo, cuando la muestra de leche contiene sustancias antibacterianas por encima de la sensibilidad de la prueba, el crecimiento bacteriano es inhibido y como resultado el color del agar permanece púrpura. Esta técnica detecta al antimicrobiano por debajo del límite de tolerancia fijada por FDA, USDA. Los niveles de detección para cloxacilina, neomicina y cefalosporinas son 20, 100 - 200 y 25 - 50 partes por billon (ppb), respectivamente (Alvarado y col, 2011).

2.4 Residuos de medicamentos en leche.

Residuo es toda sustancia química o biológica, que al ser administrada o consumida por el animal, se elimina y/o permanece como metabolito en la leche, en la carne o en los huevos, con efectos nocivos para el consumidor (Cotrino, 2001).

Los residuos más problemáticos presentes en la leche, son los que se derivan de fármacos antibacterianos, hormonas promotoras del crecimiento, y de ciertos pesticidas, metales pesados y productos químicos. El uso de éstos compuestos, hace que tomen contacto con diferentes tejidos comestibles de los animales; así se ve expuesto a ellos el ser humano (McEwen, 1997).

Tabla 3: niveles de tolerancia de algunos antimicrobianos.

Por gramo ó ml de	Músculo	Riñón	Leche
Clortetraciclina	0.05ug	0.05ug	0.015ug
Oxitetraciclina	0.5ug	0.5ug	0.1ug
Penicilina	0.05Un	0.05Un	0.01Un
DH-Estreptomicina **	0.5ug	0.5ug	0.2ug
Eritromicina	0.3ug	0.3ug	0.04ug
Lincomicina	0.6ug	0.6ug	0.15ug
Espectinomicina *	1.0ug	1.0ug	No Evaluado
Tilosina	0.3ug	0.3ug	0.04ug

Fuente: Andriksen H. S.f.

2.4.1 Causas más comunes de aparición de residuos de antibióticos.

La presencia de inhibidores en leche es responsabilidad del ganadero. La mayoría de las veces se debe a un mal manejo en la finca.

Entre las principales causas de residualidad de antibióticos, están las siguientes:

- No respetar los tiempos de retiro de los medicamentos.
- Ordeño de vacas que han presentado aborto o con períodos secos muy cortos, y que hayan sido tratadas con antibióticos de larga acción.
- Uso de medicamentos no aprobados.
- Carencia de registros de medicación.
- Sobredosificación de medicamentos.
- Aplicación de medicamentos sin recomendación del Médico Veterinario.

- Administración de medicamentos por vías no recomendadas, por los laboratorios fabricantes.
- Residuos de soluciones desinfectantes en el equipo de ordeño.
- Mezcla con leches contaminadas.
- Descarte de leche, solamente del cuarto mamario tratado con antibiótico (Botero, 1997).

2.4.2 Implicancias en la industria láctea.

Las bacterias lácticas son particularmente sensibles, a los antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de mastitis, particularmente a la penicilina (Sánchez, 1997).

Los *Streptococos* mesófilos lácticos, son parcialmente inhibidos a concentraciones de 0,1 ng/ml, y totalmente inhibidos a concentraciones de 0,2 ó 0,3 ng/ml. Los *Streptococcus thermophilus* y los *Lactobacillus*, son 10 veces más susceptibles a la penicilina, que los *Streptococcus* mesófilos (Brouillet, 1992).

Entre los principales problemas que se presentan al procesar leche con residuos de antibióticos, están:

- Formación de una cuajada inadecuada durante la elaboración del queso, la cual induce una maduración anormal;
- Disminución de la producción de acidez durante el proceso de elaboración de productos fermentados;
- Disminución del crecimiento de los cultivos lácticos, cuando se propagan en leche en polvo reconstituida (Vallejo, 1993).

2.4.3 Sustancias antimicrobianas controladas

Entre los antimicrobianos cuyos residuos han sido evaluados por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de expertos en aditivos alimentarios JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), figuran: el cloranfenicol, los nitrofuranos, la sulfadimidina, el sulfatiazol, la bencilpenicilina, la oxitetraciclina, la espiramicina y la tilosina (Parra y col., 2003).

Los siguientes antibióticos no están aprobados para utilizarlos en ganado de leche en producción: bacitracina, estreptomicina, sulfaclopiridazina, tetraciclinas y tylosina. Igualmente, no se deben aplicar en ganado de leche, los siguientes: clindamicina, cefalexina, dicloxacilina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, espectinomicina, sulfadiazina, sulfadoxina, sulfamerazina, sulfametoxazole, sulfanilamida, sulfapiridina, sulfathiazole, sulfisoxazole, sulfamerazina, sulfathiazina, sulfamethizole y sulfisoxizole (Botero, 1997)

2.4.4 Límite máximo de residuos

El límite máximo de residuos (LMR) se define como la concentración máxima de residuo de una sustancia farmacológicamente activa que puede permitirse en los alimentos de origen animal. Este límite se establece para cada producto (carne, leche, huevos) y es específica para cada especie animal. En Perú se utiliza como referencia de los límites máximos permitidos de antibióticos en leche, las normas internacionales del

Codex Alimentarius por el acuerdo de medidas sanitarias y fitosanitarias de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Guerrero y col, 2009).

Tabla 4: Límites máximos de residuos de antibióticos betalactámicos.

FÁRMACO ANTIBIÓTICO	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Codex Alimentarius
Amoxicilina	4
Ampicilina	4
Cefacetil	125
Cefalexina	100
Cefalonio	20
Cefazolina	50
Cefoperazona	50
Cefquinona	20
Ceftiofur	100
Cefuroxina	50
Cefapirina	60
Cloxacilina	30
Dicloxacilina	30
Penicilina G	4

Fuente: adaptación de *Codex Alimentarius* – FAO (2018).

2.5 antecedentes

Actualmente existen muchos estudios en la que se pueden evidenciar la presencia de residuos de antibióticos en leche:

“Frecuencia de β -lactámicos y tetraciclinas en leche fresca en la cuenca de Arequipa” El estudio tuvo como objetivo evaluar la frecuencia de β -lactámicos y tetraciclinas en muestras de leche fresca contaminadas con antibióticos en la cuenca de Arequipa. Se recolectó 616 muestras de leche en octubre de 2007, de las cuales 99 estaban contaminadas con

antibióticos. Se obtuvo una frecuencia de 88.8% para β -lactámicos y de 61.6% para tetraciclinas, habiendo diferencias altamente significativas entre ambos grupos de antibióticos ($p < 0.01$). El estudio demostró que los antibióticos pertenecientes al grupo de β -lactámicos son una importante fuente de contaminación de leche fresca en la cuenca lechera de Arequipa (Ortiz y col., 2007).

“Determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca” En el trabajo de investigación, se realizó la recolección de muestras de leche fresca en los diferentes lugares de expendio como: mercados, tiendas y algunos fundos de la ciudad de Cajamarca, con la finalidad de determinar la presencia de residuos de antibióticos, utilizando para tal efecto los métodos cualitativos del cultivo de la cepa *Stearothermophilus*, y la prueba de difusión estándar Delvotest.

Los análisis se llevaron a cabo en los Laboratorios: Regional del Norte (LABRENOR) y en la Industrias Cajamarquinas Lácteas (INCALAC), del Distrito Baños del Inca, Provincia de Cajamarca. Se trabajaron 216 muestras de leche fresca, entre diciembre 1990 a febrero 1991, los cuales dieron los siguientes resultados.

Los resultados en promedio (20.83%) indican un alto nivel de contaminación con antibióticos de la leche fresca que consume la población de Cajamarca, que es indicativo además de la inexistencia de un control sanitario en la comercialización de leche fresca, así como evidencia el uso indiscriminado de antibióticos en vacas en producción

en la campaña de Cajamarca y el serio riesgo que significa para la salud de los consumidores en especial de lactantes y niños (Llanos, 1991).

“Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas comercializada en el Callao” cuyo resumen es: se analizaron cuarenta muestras de leche cruda comercializada en mercados del distrito del Callao, entre enero y marzo del 2009, empleando el método presuntivo para antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas de IDEX Laboratories, el cual cumple con los límites de sensibilidad de residuos de la FDA. Se encontró 40% de muestras con resultado positivo para residuos de β -lactámicos en leche cruda. No se registran resultados positivos al analizar tetraciclinas. Los resultados sugieren que se deberían establecer políticas de legislación, regulación y capacitación, y que la NTP 202.001.2003 debería ser revisada (Guerrero, 2009).

“Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche de vacas tratadas contra mastitis”. El estudio tuvo por objetivo determinar la frecuencia de residuos de antibióticos en leche de vacas luego del periodo de descarte (tres días) de leche por tratamiento contra la mastitis con antibióticos betalactámicos. Muestras de leche de 60 vacas se analizaron mediante la prueba inmunoenzimática SNAP (Betalactam), que indica la presencia de antibióticos betalactámicos en leche. El 45.0% (27/60) resultó positivo a residuos de antibióticos. En relación al tipo de antibiótico utilizado, el 56.0% (14/25), 26.7% (4/15) y 45.0% (9/20) de las muestras de animales tratados con la asociación penicilina y estreptomina, kanamicina y

penicilina, y amoxicilina y ácido clavulónico, respectivamente, fue positiva a la prueba. Asimismo, el 50.0% (14/28) de los animales tratados por vía intramuscular y 40.6% (13/32) por vía intramamaria fueron positivos; y el 46.7%(7/15), 57.1% (12/21) y 33.3% (8/24) de las vacas de baja, media y alta producción, respectivamente, fue positiva a la prueba; aunque sin que hubiera una asociación estadística entre el tipo de antibiótico, vía de administración, y nivel de producción con la presencia de residuos de antibióticos (Salas y col., 2013).

“Residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en la región de Tierra Caliente, de Guerrero, México” Los residuos de antibióticos en leche y en los productos de origen animal ha aumentado en los últimos años, representando un riesgo para la salud pública. Por ello y debido a que en la Tierra Caliente del Estado de Guerrero en México, se producen alrededor de 11.9 millones de litros de leche al año, se realizó la presente investigación para conocer la prevalencia de residuos de antibióticos en la leche cruda comercializada en la Región. Mediante muestreo probabilístico, se analizaron 129 muestras con el Kit comercial Delvotest® SP para detectar residuos de antibióticos, de las cuales, 24 (18.60%) resultaron positivas, las restantes 105 (81.40%) fueron negativas. El municipio de Ajuchitlán del Progreso, presentó la mayor prevalencia (37.5%). Mientras que en Cutzamala de Pinzón, de 12 muestras analizadas ninguna fue positiva. Pungarabato presentó 28.57% de muestras positivas. Coyuca de Catalán mostró un 25% de positividad en 12 muestras analizadas. Zirándaro tuvo una prevalencia del 18.75% Tlapehuala 16.67%, Arcelia 15.38%, San Miguel Totolapan 14.29%, y

Tlalchapa el 10%. Del total de muestras analizadas, el 66.67% procedían de productores quienes la comercializan directamente al público, mientras que el restante 33.33% fue comercializada por revendedores o boteros. La leche comercializada por los productores, mostró mayor presencia de residuos de antibióticos (11.63%), mientras que la comercializada por los revendedores presentó un 6.97% de prevalencia. En la región de Tierra Caliente de Guerrero se expende leche cruda con residuos de antibióticos, poniéndose en riesgo la salud de la población (Camacho y col., 2010).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

Las muestras se recolectaron de 5 comunidades del distrito de Taraco: Tuni Requena, Patascachi, Tuni Grande, Collana y Huancollusco. El distrito de Taraco se encuentra ubicado en la región sierra del Perú; en el piso ecológico suni, por encontrarse comprendida dentro de los 3,500 a 4,200 m.s.n.m. al norte del departamento de Puno y oeste de la capital de la provincia de Huancané, a orillas del lago Titicaca. La temperatura promedio en época de lluvia es 15°C, mientras que en época seca es de 7°C. Geográficamente está ubicado en las coordenadas 15°17'54"S 69°48'44"O (SENAMHI).

Para la ejecución del presente trabajo se recolectó un total de 100 muestras de leche fresca cruda, proveniente de 100 proveedores o productores que expenden su producto diariamente a queseros de la zona o a la empresa Gloria S.A.

3.2 Muestra

La cantidad de muestras a analizar, se obtuvo mediante la fórmula descrita por Wayne, (1999).

$$n = \frac{Z^2 (p)(q)}{E^2}$$

Donde:

n = tamaño de muestra (98)

Z = nivel de confianza (93%)

E = error (7%)

p = probabilidad (18%) resultados obtenidos por otros investigadores.

$$n = \frac{1.81^2 (0.18)(0.82)}{0.07^2} = 96.8$$

El tamaño de muestra resultó 96.8, sin embargo decidimos trabajar con 100 muestras, ya que el total de las pruebas del kit son 100.

3.3 Materiales de laboratorio

- Tubos de ensayo de 15 mL limpios y estériles.
- Micropipetas automáticas.
- Canastillas.
- Jeringas dosificadoras.
- Pinzas plásticas.
- Pipetas plásticas.
- Fichas de trabajo.

3.4 Equipos

- Autoclave
- Estufa
- Horno eléctrico
- Refrigerador
- Baño maría.

3.5 Cultivo

Ampollas con *Bacillus stearothermophilus* (kit Desvotest® SP-NT)

3.6 Metodología

Para la determinación de residuos de antibióticos en leche fresca se empleó la prueba de Difusión Estándar Delvotest. Según el fabricante, el procedimiento es como sigue:

- a) Precalentamiento del incubador. La temperatura del incubador de calor o del baño de agua deberá establecerse en 64°C ($\pm 2,0^{\circ}\text{C}$).
- b) Seleccione la cantidad necesaria del material para analizar. Separe una o más ampollas o bloques según el número de muestras que desee analizar. Utilice tijeras o un cuchillo, si fuera necesario. Procure no romper la lámina del resto de la bandeja para evitar el secado de las ampollas. Guarde inmediatamente las pruebas que no utilice en las condiciones de almacenamiento recomendadas. Perfore la lámina de aluminio para abrir la ampolla.
- c) Añada las muestras de leche. Las muestras de leche deben ser homogéneas y representativas del lote que se está analizando. Al analizar la leche de una vaca en particular, evite analizar la leche inicial que sale de la ubre. Ordeñe los cuatro cuartos y asegúrese de mezclar la leche cuidadosamente, evitando que se forme espuma. En ningún caso debe utilizarse la misma pipeta desechable en más de una muestra. Como se requiere muy poca cantidad de leche para un análisis, una sola gota que haya quedado de una muestra anterior podría contaminar la muestra. Introduzca en las ampollas 0,1 ml de cada leche a analizar. Utilice una punta de pipeta limpia y nueva para cada muestra. Escriba la referencia de las muestras en el tubo de ensayo para identificarlas.

- d) Incube el test. Al utilizar placas, cubrir la prueba con una hoja adhesiva incluida en la caja. Introduzca las placas o ampollas en un aparato de incubación precalentado (incubadora de calor seco o un baño de agua). Deje incubar los test durante 3 horas o utilice control de tiempo.
- e) **Lectura.** El color resultante se podrá visualizar en los 2/3 inferiores de la ampolla o por debajo de la placa. Una muestra resulta negativa cuando el color es (parcialmente) amarillo. En ese caso, la muestra de leche analizada no contiene antibióticos o la concentración está por debajo del nivel de detección. Si una muestra se ve claramente violeta o púrpura es considerada positiva. La muestra de leche contiene antibióticos en concentraciones por encima del umbral de detección (inserto adjunto del kit).

3.6.1 Recolección y transporte de muestras

Se recolectaron muestras de leche fresca de cinco comunidades del distrito de Taraco: Tuni Requena, Patascachi, Tuni Grande, Collana y Huancollusco empleando jeringas desechables de 10 mL las que fueron depositadas en los tubos de ensayo limpios y estériles. Luego fueron transportados en condiciones de refrigeración a 4°C aproximadamente, al laboratorio de bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA - Puno, para su procesamiento de forma inmediata.

Los análisis se realizaron con muestras obtenidas en dos muestreos: en febrero (época de lluvia) y en abril (época seca).

3.6.2 Análisis de datos

Se utilizó la estadística descriptiva, promedio, porcentaje y representación gráfica con diagrama de barras.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina en la Microcuenca del distrito de Taraco.

Tabla 5: determinación de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina en la microcuenca del distrito de Taraco.

	Muestras analizadas	Números y porcentajes de muestras positivas	
		Nro.	%
Total	100	20	20

Tabla 6: determinación de residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina, por épocas, en la microcuenca del distrito de Taraco.

Épocas	Muestras analizadas	Números y porcentajes de muestras positivas	
		Nro.	%
Febrero (lluvia)	50	13	26
Abril (seca)	50	7	14
Total	100	20	20

En la tabla 6 se muestra los positivos a residuos de antibióticos en leche fresca en dos épocas marcadas en el altiplano: época de lluvia y época seca, en la primera se encontró 26% de positivos y en la segunda 7%, respectivamente.

Tabla 7: muestras positivas por comunidades del distrito de Taraco.

COMUNIDAD	Nº DE MUESTRAS	MUESTRAS POSITIVAS	%
Tuni Requena	20	3	15
Patascachi	20	2	10
Tuni Grande	20	6	30
Collana	20	4	20
Huancollusco	20	5	15

En la tabla 7 se muestran las comunidades del distrito de Taraco que tuvieron el número de muestras positivas. La comunidad de Tuni grande tuvo el mayor porcentaje de positivos con un 30% frente a la comunidad de Patascachi con un 10%.

4.2 Discusión

Como se puede observar en la Tabla 6, de las 100 muestras analizadas, un 20% resultaron positivas y un 80% resultaron negativas. El estudio efectuado revela la presencia de residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca ofertada por productores del distrito de Taraco.

Un estudio realizado en Lima (Salas y col, 2013). Encontró un 45% de positivos a residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca, lo que a nuestro entender y de acuerdo a las normas internacionales estos niveles son superiores a los límites máximos permisibles de residuos de antibióticos betalactámicos en leche según la norma europea

(FAO/OMS, 2007). La prueba lo hizo con un kit diagnóstico comercial SNAP Betalactam de IDEXX Laboratories Inc. Sin embargo, el estudio se hizo después de tres días de haber culminado el tratamiento con betalactámicos contra la mastitis, probablemente ello ha podido influir en el alto porcentaje de positivos ya que el ritmo horario de administración para las penicilinas naturales, a nivel del mar, será de cada 8 hrs la sódica, cada 24 hrs la procaína y cada 72-96 hrs la benzatina (Pérez, 2010). En altura estos tiempos varían, por ejemplo, para la penicilina sódica el intervalo de aplicación es cada 3 - 4 horas, lo que indica que el tiempo de eliminación en la costa es más lenta que en altura (Zavaleta, 2012).

Por otro lado, un estudio realizado en leche comercializada en el Callao (Guerrero y col, 2009) encontró un resultado de 40% de positivos para residuos de antibióticos betalactámicos, la prueba se hizo también con pruebas de IDEXX Laboratories, pero las muestras fueron colectadas de los mercados, las que han podido ser alteradas en su dilución o mezcla con leches contaminadas por parte de los vendedores. En comparación con nuestro trabajo, encontraron el doble de positivos, pero volvemos a decir que quizá un punto de alteración pudo suceder en la colección de muestras.

Otro trabajo realizado en las instalaciones de la planta de Majes de la empresa Gloria S.A. en Arequipa (Ortiz y col., 2008) donde las muestras se analizaron con la prueba cualitativa CH ATK microplate P&S (COPAN, Italia) con el cual llegaron a un 16% de positivos a residuos de

antibióticos betalactámicos la misma que fue corroborado con el test Snap®Beta-Lactam de IDEXX Laboratories (EE UU) dando el mismo resultado (16%). Este estudio fue realizado con dos métodos y llegaron al mismo resultado lo que indica que ambos métodos son confiables. En relación a estudios anteriores este resultado es menor y tiene cierta cercanía con el resultado a la cual arribamos.

En un estudio realizado en Cajamarca (Llanos, 2002), el 20% de muestras dieron positivas a residuos de antibióticos, un resultado exactamente igual al que arribamos en el presente estudio, pero estas muestras provenían de mercados, tiendas, y fundos donde los residuos están diluidos, dado que la leche de vacas positivas se mezcla con leche de vacas negativas. Por otro lado, en ese estudio se emplearon pruebas microbiológicas en placa, que son menos sensibles para detectar dichos residuos. En el presente estudio, las muestras se analizaron con el kit Delvotest que es más precisa y está aprobada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

En otros países como México, hicieron también investigaciones sobre el tema, en un estudio en el estado de Guerrero (Camacho y col., 2010), donde de manera general se encontró un 18,6% de positivos a residuos de antibióticos betalactámicos, el estudio se realizó en 9 municipios donde en cada municipio se colectó un promedio de 14 muestras y un total de 129 muestras, consideramos que 14 muestras para todo un municipio es muy poco, lo que puede influir en los resultados, pero el

resultado general que es 18.6% esta muy cerca de nuestro resultado que es el 20% de positivos a residuos de antibióticos betalactámicos.

V. CONCLUSIONES

En el distrito de Taraco, provincia de Huancané, departamento de Puno, se encontraron 20% de positivos a residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina.

En época de lluvias se encontró 13 muestras positivas, lo que representa el 26% y 7 muestras positivas en época seca, representando el 14% de muestras positivas a residuos de antibióticos betalactámicos.

La comunidad que presentó mayor número de positivos a residuos de antibióticos betalactámicos en leche, fue la comunidad de Tuni Grande con un 30%.

VI. RECOMENDACIONES

Los ganaderos productores de leche deben ser capacitados a través de campañas educativas de salud para que puedan cumplir con el periodo de retiro y hacerles ver los riesgos que se tiene al comercializar leche con residuos de antibióticos.

La municipalidad distrital de Taraco, como otras, y el Ministerio de Salud deben promover el cuidado de la salud pública, los mismos que deben empadronar y autorizar a los productores de leche que cumplan con las normativas nacionales e internacionales referidos a calidad de leche.

.

VII. REFERENCIAS

- Althaus, R. y col. 2003. Detection Limits of Antimicrobial in Ewe Milk by Delvotest Photometric Measurements. J. Dairy Sci., vol. 86, n° 2, p. 457 – 463.
- Alvarado, A. 2011. Detección de residuos de una suspensión antibiótica comercial en base a amoxicilina y gentamicina (Amoxigentin) en leche vacuna. En www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/antibiotico-en-leche-t29290.htm.
- Andersen, H. S.f. Control de calidad en Medicina Veterinaria. Obtenido en www.visionveterinaria.com/prion/control.html - 31k
- Badui, D. S. 2006. Química de los alimentos. Cuarta edición. México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Botero, J. 1997. Estrategias para el control de fármacos y otros residuos en leche. En: Seminario Residuos químicos en alimentos: implicaciones en salud pública y comercio internacional. Bogotá, septiembre 12 y 13 de 1997. Revista ACOVEZ. 14 p.
- Brouillet, P. 1992. Les résidues inhibiteurs dans le lait vache a la production. GTV 92-4.
- Cabrera, M. y col. 2003. Cómo obtener leche de buena calidad. Obtenido en la Red Mundial en 27/11/2017. www.turipana.org.co/leche.htm - 52k
- Camacho, L. M. y col. 2010. Residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en la región Tierra Caliente, de Guerrero, Mexico. REDVET. Rev. Electrón. vet. Vol. 11, N° 02
- Carmona, G. S.f. Períodos de retiro de medicamentos. Guía de referencia. Farmaconoticias. Obtenido en la Red Mundial en 10/05/18
- Cottrino, V. 2001. Residuos de antibióticos. En: Memorias de curso “Cómo producir leche de óptima calidad. Bogotá.
- Cottrino, V. y Gaviria, B. 2003. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Explotaciones Ganaderas. Mastitis y Calidad de la Leche. Obtenido en la Red Mundial en 22/03/18. www.fedegan.org.co/81manejoIntegrado.html-55k.
- Croall, S. 1999. Un nuevo modelo sueco. Publicado por el Instituto sueco. Nro 424, 11 páginas. Obtenido en <http://www.si.se/spa/ssverige/ass>

424.html.

- Guerrero, D. y col. 2009. Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche cruda comercializada en el Callao. Rev. Ciencia e Investigación 2009; 12(2): 79-82 Fac. Farmacia y Bioquímica UNMSM.
- Llanos, G. 2002. Determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca. Rev. Amazónica de Investigación Alimentaria v.2 n°2 p. 35-43.
- Mcewen S.A. y W.B. McNab 1997. Contaminantes no bióticos en alimentos de origen animal. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 16 (2), 684-693.
- Norma técnica peruana 2003. Leche y Productos Lácteos. Leche Cruda Requisitos, Lima: Perú, 4a edición.
- Ortiz, C.; Vera, R.; Cayro, J. 2008. Frecuencia de β -lactámicos y tetraciclinas en leche fresca en la cuenca de Arequipa. Rev Inv Vet, Perú 19(2): 140-143.
- Pérez, R. 2010. Farmacología Veterinaria. Universidad de Concepción. Chile.
- Parra, M. H. y col. 2003. Los residuos de medicamentos en la leche, problemática y estrategia para su control. Manual técnico CORPOICA, Colombia.
- Pérez, R. 2010. Farmacología Veterinaria. Universidad de Concepción. Chile.
- Rodriguez, J. 2003. Antibióticos, piensos legales y piensos ilegales. Obtenido en la Red Mundial en 22/03/18.
www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2003/02/19/5193.php-39k.
- Sánchez, G. 1997. Residuos de fármacos antimicrobianos en alimentos de origen animal. Problemática general. Revista ACOVEZ, Vol. 20 N° 3. pp. 26 – 29.
- Salas, P. y col. 2013. Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche de vacas tratadas contra mastitis. Rev Inv Vet Perú 2013; 24(2): 252-255.
- Sumano, L. H., C. L. Ocampo, 2006. Farmacología Veterinaria. Edit. Mc Graw – Hill interamericana. México.

- Vallejo, M. C. 1993. Residualidad de los plaguicidas en los alimentos. Toxicología y seguridad de los alimentos. Primera edición. Fondo nacional universitario. Bogotá.
- Veisseyre, R. Lactancia Técnica. Editorial Acribia. 2da. Edic. España 1980.
- Wattiaux, M. Lactancia y Ordeño. Capítulo 19: Composición de la leche y valor nutricional Obtenido en www.babcock.cals.wisc.edu/spanish/de/html/ch19/lactation_spn_ch19.html - 40k
- Wayne, W. D. 1999. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a. Edic. Edit. Limusa. México D.F.
- Zavaleta, M.R. 2012. Farmacología y Terapéutica Anti infecciosa Veterinaria. Edit. UNA – Puno – Perú.

ANEXOS

A.

FICHA DE REGISTRO DE MUESTRAS

COMUNIDADES	N° DE MUESTRAS	POSITIVOS	NEGATIVOS
TUNI REQUENA	20	3	17
PATASCACHI	20	2	18
TUNI GRANDE	20	6	14
COLLANA	20	4	16
HUANCOLLUSCO	20	5	15

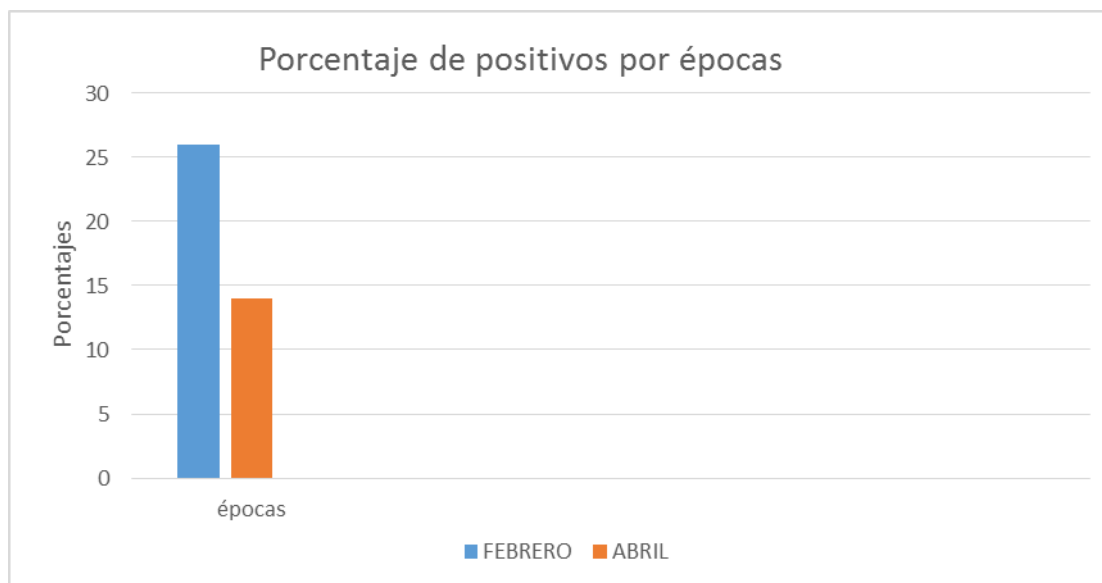


Figura 1: presencia de residuos de antibióticos por épocas.

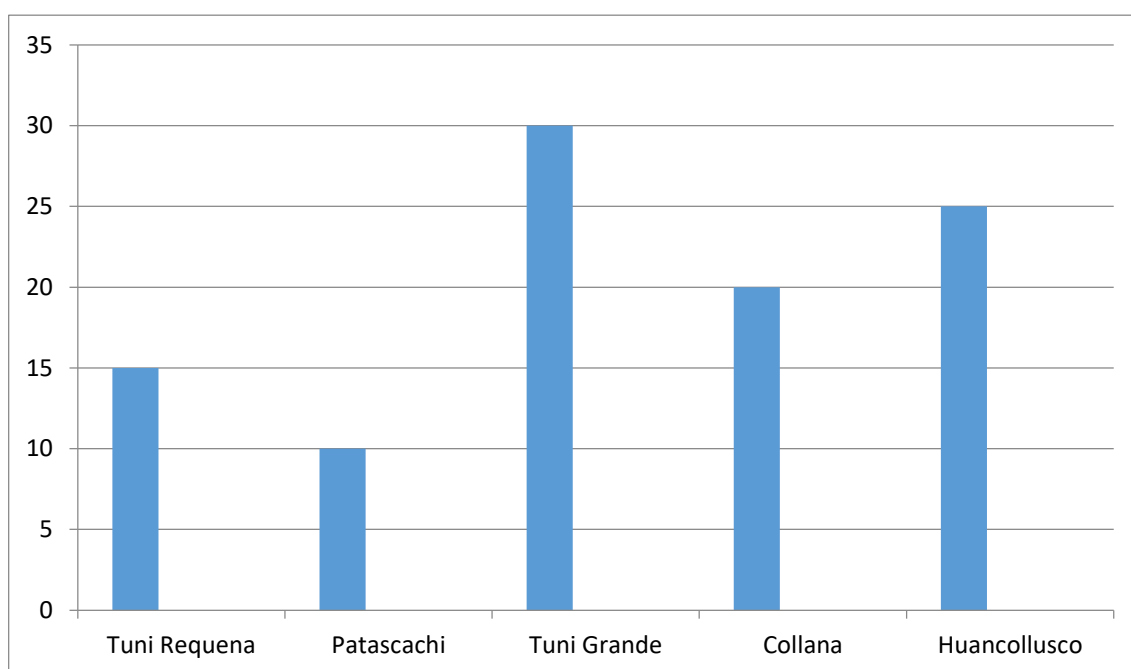


Figura 2: presencia de residuos de antibióticos en las comunidades del distrito de Taraco.



Figura 3: colección de muestras en campo.



Figura 4: refrigerado de muestras.



Figura 5: remitado de muestras al laboratorio.



Figura 6: kit Delvotest.



Figura 7: adición de muestra a las ampollas de la prueba.



Figura 8: incubación de la muestra.



Figura 9: observación pos incubación.

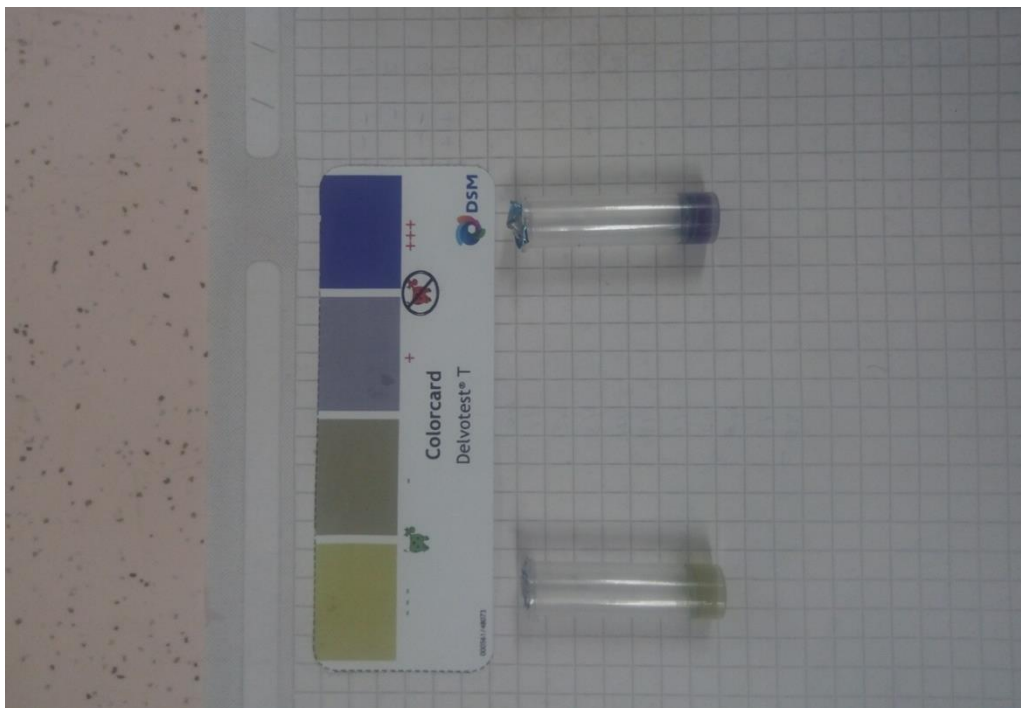


Figura 10: lectura de coloración.